

<学会記録>4. 口腔扁平上皮癌の浸潤転移関連遺伝子の探索(東日本歯学会第19回学術大会 一般講演抄録)

著者名(日)	木下 隆二, 奥村 一彦, 萩野 司, 荒川 俊哉, 岡崎 有志, 田隈 泰信, 金澤 正昭
雑誌名	東日本歯学雑誌
巻	20
号	1
ページ	106-107
発行年	2001-06-30
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00008609/

マラッセ上皮細胞を用いた。細菌感染を想定して、Lipopolysaccharide (LPS)を1,10,100,1000ng/ml培養液に添加したものと、添加していないものをコントロールとして用いた。炎症性サイトカインとして、IL-6, IL-8, GM-CSFのmRNAの発現を観察するために、RT-PCR法を行った。各々の細胞からtotal RNAを抽出し、Oligo (dT)プライマーによりcDNAを作製した後、各々に特異的なプライマーを用い、一部は通常のThermal cyclerによる増幅を行い、他はLightCyclerにより定量的

PCR法を行った。いずれも、internal controlとしてG3 PDHを用いたものも合わせて行った。

【結果および考察】LPSを添加しない、通常の培養条件で、いずれのサイトカインの発現も観察された。LPSを添加し、各々の発現の変化を定量的に観察すると、IL-8とGM-CSFの発現の上昇がLPS濃度依存性に観察された。以上の結果から、歯根嚢胞の裏装上皮となりうるマラッセ上皮から炎症性サイトカインが分泌され、その一部は細菌感染によって刺激されることが示唆された。

3. 口腔上皮性疾患における β ディフェンシン2のタンパクおよびmRNAの発現

○草野 薫, 安彦 善裕, 荒川 俊哉*,
西村 学子**, 田隈 泰信*, 溝口 到***,
賀来 亨

(北海道医療大学歯学部口腔病理学講座・*北海道医療大学歯学部口腔生化学講座・

北海道医療大学歯学部附属病院中央検査部・*北海道医療大学歯学部矯正歯科学講座)

【目的】 β ディフェンシン2 (hBD-2)は、口腔上皮細胞でも発現している抗細菌性ペプチドであり、in vitroでの実験で、細菌や炎症性サイトカインにより発現の変動することが明かになってきている。しかしながら、in vivoでの局在様式は明らかにされていない。本研究では、角化の程度が異なる様々な部位の正常口腔上皮および様々な口腔上皮性疾患におけるhBD-2の発現をタンパクおよびmRNAレベルで明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】材料には、口腔原発の扁平上皮癌(SCC)、白板症、扁平苔癬、およびそれらの周囲の正常組織を用いた。hBD-2のタンパクの局在を明らかにするため、抗ヒトhBD-2抗体を1次抗体とした免疫組織化学染色を行った。また、hBD-2 mRNAの局在を明らかにす

るため、hBD-2 cDNAからDIG標識RNAプローブを作製し、in situ hybridizationを行った。

【結果と考察】hBD-2のタンパクの局在は、正常口腔上皮では口蓋部などの角化したところの角質層では弱陽性、SCCの角質球や白板症の過角化の部分では強陽性を示していた。これに対して、hBD-2 mRNAは口腔底や頬粘膜などの非角化上皮では上皮層上層に著明な発現がみられたが、正常の角化上皮および白板症の過角化上皮では発現がわずかであった。以上のことから、hBD-2タンパクは角質層に貯留することによってその機能を発揮し、非角化部では貯留する場がないことから、mRNAの発現強くなっているものと考えられた。

4. 口腔扁平上皮癌の浸潤転移関連遺伝子の探索

○木下 隆二, 奥村 一彦, 萩野 司,
荒川 俊哉*, 岡崎 有志, 田隈 泰信*,
金澤 正昭

(北海道医療大学歯学部口腔外科第一講座・*北海道医療大学歯学部口腔生化学講座)

【目的】口腔癌の治療は近年の治療技術により局所制御率は向上したが、一方、舌癌をはじめとして所属リンパ節転移や遠隔転移により予後不良となる例もみられ、治療に苦慮することがある。そこで、早期に浸潤転移が予測できるようなマーカー、および転移制御に向けての治

療の確立が急務と考えられる。そこで、舌原発扁平上皮癌細胞を用いて、Differential Display法により浸潤性に差のある癌細胞間で発現しているmRNAの差異を検索し、浸潤転移を制御する遺伝子の探索を試みた。

【材料と方法】ヒト舌原発癌から樹立されたSAS細胞か

ら限界希釈法によって得られたクローンを肺血管内皮細胞層下への癌細胞潜り込みを指標にした浸潤アッセイで選択した、高浸潤性クローンSAS-H1と低浸潤性クローンSAS-L1を用いた。方法は、タカラの蛍光ラベルdifferential display kitを用いて行った。すなわち、各クローンからTotal RNAを抽出し9種類のローダミンラベルされたdown streamプライマーと24種類のupstreamプライマーを用いて216通りの組み合わせを使用しPCR反応を行った。次に、変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、両者間で異なる発現を示すバンドをゲルから切り出し回収した cDNA断片をPCRで再増幅後、pUC18ベクターにつなぎ込みの検討を行った。ABI Genetic

Analyzer 310シーケンサーを用いてその塩基配列の決定を行った。

【結果と考察】RT-PCRで再現性を確認できた遺伝子として、1つは低浸潤性で強く発現していた390bpのcDNA断片でLIEG-1と名付け、もう一方は高浸潤性で強く発現していた288bpのcDNA断片でHIEG-1と名付けた。各々の塩基配列についてBLASTを用いたホモロジー検索を行ったところ、低浸潤性で強く発現するcDNA断片LIEG-1は1番染色体に存在するRP5-926E3のヒトDNAに100%一致する結果が得られた。一方、高浸潤性で発現が増強したHIEG-1遺伝子については相同性のある既存の遺伝子は得られなかった。

5. 放射線および過酸化水素により誘導されるアポトーシスについて

○細川洋一郎, 田中 力延, 金子 昌幸,
敦賀 英知*, 入江 一元*, 坂倉 康則*,
矢嶋 俊彦*

(北海道医療大学歯学部歯科放射線学講座・*北海道医療大学歯学部解剖学第一講座)

【目的】放射線誘発アポトーシスにおいても、最終的にはカスパーゼによりエンドヌクレアーゼが活性化され、DNA切断化がおり細胞死にいたるとするのが定説になってきている。しかし、放射線のfirst targetおよび初期反応の作用機序は不明である。我々はアポトーシス発生原因とされているOHラジカル量をESRで測定したところ、放射線照射の場合と過酸化水素の場合では、その量に違いのあることに気がついた。これは両刺激の作用場所および初期課程が異なる可能性を伺わせる。そこで今回、両刺激によって誘導されるアポトーシスにおいて、発現する蛋白の違いに注目し、検討を行った。

【材料と方法】細胞はHL60細胞（ヒト骨髄性白血病細胞）を使用した。この細胞に放射線4Gy照射または100 μ Mの過酸化水素を暴露させ、その後の細胞死、DNA断片化、蛋白の発現について経時的に観察した。

【結果と考察】p53positive controlであるMolt-4と比較したところ、放射線照射および過酸化水素によって誘導されるアポトーシスでも、HL60はp53の発現がみられなかった。HL60は放射線照射および過酸化水素暴露後、6時間までにDNA断片化を起こした。この極大期に、Western blotでカスパーゼ3およびその基質であるPARPが活性化されるのが観察された。また放射線照射においてはp21が発現し、Bax, cytochrome CおよびFas抗原(CD95)が発現していたのに対し、過酸化水素暴露ではFas抗原はみられたもののp21の発現はみられなかった。以上の結果から、p53欠損株であるHL60でもミトコンドリアを介した系でアポトーシスを起こしている可能性が考えられる一方、放射線照射と過酸化水素暴露では系に違いのある可能性が示唆された。

6. *Porphyromonas gingivalis*のrgp A遺伝子産物のHGP44の共凝集への関与について

○鎌口 有秀, 鈴木真由美, 宮川 博史,
馬場 久衛

(北海道医療大学歯学部口腔細菌学講座)

【目的】成人性歯周病の主原因細菌の1つである*Porphyromonas gingivalis*の歯周局所への付着機構の1つ

として既に付着している細菌に結合することによりその目的を達成する可能性が考えられており、この現象は試